This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В СООТВЕТСТВИИ С ДОГОВОРОМ О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (PCT)

**(19) ВСЕМИРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**
Международное бюро

ВОИС
PCT

(43) Дата международной публикации:
14 июня 2001 (14.06.2001)

(10) Номер международной публикации:
WO 01/42443 A1

(51) Международная патентная классификация ^{7}: C12N 15/00, 15/63 // A01N 48/00

(21) Номер международной заявки: PCT/RU00/00504

(22) Дата международной подачи: 7 декабря 2000 (07.12.2000)

(25) Язык подачи: русский

(26) Язык публикации: русский

(30) Данные о приоритете:
99125827 9 декабря 1999 (09.12.1999) RU

(71) Заявитель *(для всех указанных государств, кроме (US):* **ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ ИМ. В.А.ЭНГЕЛЬГАРДТА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК** [RU/RU]; 117984 Москва, ул. Вавилова, д. 32 (RU) [**INSTITUT MOLEKULYARNOI BIOLOGII IM. V.A ENGELGARDTA ROSSIISKOI AKADEMII NAUK**, Moscow (RU)].

(71) Заявитель и
(72) Изобретатель: **ЧУРИКОВ Николай Андреевич** [RU/RU]; 117418 Москва, ул. Цюрупы, д. 7, корп. 2, кв. 55 (RU) [**CHURIKOV, Nikolai Andreevich**, Moscow (RU)].

(74) Агент: **ВЫСОЦКАЯ Нина Николаевна**, ООО «СОЮЗПАТЕНТ»; 103735 Москва, ул. Ильинка, д. 5/2 (RU) [**VYSOTSKAYA, Nina Nikolaevna**, Moscow (RU)].

(81) Указанные государства *(национально):* JP, US.

(84) Указанные государства *(регионально):* европейский патент (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

Опубликована
С отчётом о международном поиске.

В отношении двухбуквенных кодов, кодов языков и других сокращений см. «Пояснения к кодам и сокращениям», публикуемые в начале каждого очередного выпуска Бюллетеня PCT.

WO 01/42443 A1

---

(54) Title: METHOD FOR MODIFYING GENETIC CHARACTERISTICS OF AN ORGANISM

(54) Название изобретения: СПОСОБ ИЗМЕНЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ОРГАНИЗМА

(57) Abstract: The invention relates to the field of molecular biology, molecular genetics, and biotechnology and can be used for purposes of genotherapy as well as in agriculture, industrial biotechnology for-gene specific silencing of genes whose expression promotes the development of different diseases and infringes upon a process for producing a required product. The invention proposes a method for modifying the genetic characteristics of organisms by means of RNA interference resulting in the gene-specific silencing of the selected gene with the aid of RNA molecules. The molecules are synthesised *in vitro* using the RNA molecules which are complementary in a parallel direction with (pcRNA) mRNA of the selected gene which are synthesised *in vivo or in vitro* on an artificial sequences of DNA which possesses a mirror-symmetrical sequence of nucleotides in respect to the sequence of the gene nucleotides. The invention provides a general approach to the modification of the genetic characteristics of an organism based on the biological characteristics of mirror-inverses of the nucleotide sequences being achieved through RNA-interference which brings about gene-specific silencing.

[Продолжение на след. странице]

---

(57) Реферат: Изобретение относится к области молекулярной биологии, молекулярной генетике и биотехнологии и может быть использовано для целей генотерапии в медицине, а также в сельском хозяйстве и в промышленной биотехнологии для ген-специфического сайленсинга тех генов, экспрессия которых способствует развитию тех или иных заболеваний или нарушает процесс наработки необходимого продукта.

Предложен способ изменения генетических свойств организмов путем РНК-интерференции, приводящей к ген-специфическому сайленсингу выбранного гена с помощью молекул РНК, синтезированных *in vitro*, при этом используют молекулы РНК, комплементарные в параллельном направлении (пкРНК) мРНК выбранного гена, которые синтезируют *in vivo* или *in vitro* на искусственной последовательности ДНК, имеющей зеркально-симметричную последовательность нуклеотидов по отношению к последовательности нуклеотидов гена.

Изобретением предложен общий подход к изменению генетических свойств организма, основанный на биологических свойствах зеркальных инверсий нуклеотидных последовательностей и реализующийся в РНК-интерференции, приводящей к ген-специфическому сайленсингу.

Способ изменения генетических свойств организма

Область техники

Изобретение относится к области молекулярной биологии, молекулярной генетике и биотехнологии и может быть использовано для целей генотерапии в медицине, а также в сельском хозяйстве и в промышленной биотехнологии для ген-специфического сайленсинга тех генов, экспрессия которых способствует развитию тех или иных заболеваний или нарушает процесс наработки необходимого продукта.

Уровень техники

Известны разные способы изменения генетических свойств организма. Одни из них предполагают повреждение самого гена. К их числу относится так называемый “нокаут” генов. Эти подходы предполагают внесение повреждений (мутаций) в выбранном гене в клетках зародышевого пути или в стволовых клетках и поэтому далеко не всегда могут использоваться для изменения свойств развившегося организма [L.V. Varga, S. Toth, I. Novak, A. Falus, Immunol. Lett., 1999, vol. 69, p. 217; J. Osada, N. Maeda, Methods Mol. Biol., 1998, vol.110, p. 79].

В последние годы вызывает повышенный интерес другой подход к изменению генетических свойств организма - использование РНК-интерференции, приводящей к ген-специфическому сайленсингу, при котором ген не повреждается, а изменяется его регуляция [M.K. Montgomery, A. Fire, Trends in Genetics, 1998, vol.14, p. 255; P. Sharp, Genes & Development, 1999, vol.13, p.139]. РНК-интерференция может использоваться для ген-специфического сайленсинга на любых стадиях развития, в том числе и для изменений свойств взрослого организма. Повышенное внимание к исследованиям РНК-интерференции связано с тем, что они позволили случайно обнаружить ранее неизвестные древние механизмы генной регуляции. Физиологическая роль этих механизмов может заключаться в изменении в локальных структурах хромосом, во влиянии на активность транскрипции, на процессинг мРНК, ее транспорт в цитоплазму и на ее стабильность.

К настоящему времени РНК-интерференция, приводящая к ген-специфическому сайленсингу, описана на различных организмах - нематоде, дрозофиле, грибах, растениях.

Известен способ изменения генетических свойств организма, основанный на РНК-интерференции с использованием для этой цели антисмысловой РНК (асРНК), которая комплементарна в антипараллельном направлении мРНК выбранного гена, синтезируется *in vitro* и вводится в организм [A. Fire, S-Q. Xu, M.K. Montgomery, S.V. Kostas, S.E. Driver, C.C. Mello, Nature, 1998, vol. 391, p. 806].

Описанный способ осуществляют следующим образом:

1. Выбирают ген, активность которого нежелательна;
2. Готовят генетическую конструкцию, в которой данный ген или соответствующая ему кДНК (последовательность, соответствующая мРНК), т.е. природная ДНК, ориентирована в противоположном направлении и находится под контролем нужного промотора. Этим обеспечивается транскрипция незначащей цепи гена. Для получения конструкций используют разнообразные векторы, которые могут содержать последовательности ДНК, важные для селекции трансформанта, для эффективной экспрессии перевернутого гена и для "правильного вписывания" конструкции в хромосомные домены;
3. На полученной конструкции *in vitro* синтезируют и вводят в организм асРНК с помощью разных методов (электропорация, иньекции, *per os*).

Существенным недостатком этого способа изменения генетических свойств организма с помощью РНК-интерференции является то, что при использовании конструкций, предназначенных для синтеза асРНК в результате перестроек может произойти реверсия, т.е. прекратится экспрессия асРНК и начнется синтез последовательности соответствующей цепи мРНК. Т.е. вместо подавления активности выбранного гена можно получить его активирование. Синтез цепи мРНК может также начаться из-за того, что в месте инсерции конструкции могут оказаться последовательности хозяина, имеющие промоторную активность в цепи, соответствующей цепи мРНК. Вероятность таких событий высока.

Наиболее демонстративно высокая вероятность реверсий подтверждена работами с трансгенными организмами. Конструкции при этом вводились с противоположной целью - добиться большей активности какого-либо гена. Однако, реверсии в результате спонтанного активирования транскрипции с противоположной цепи проводили не к увеличению активности гена, а к полному ее подавлению, т.е. к ген-специфическому сайленсингу в результате РНК-интерференции [M.K. Montgomery, A. Fire, Trends in Genetics, 1998, vol.14, p. 255; P. Sharp, Genes & Development, 1999, vol.13, p.139].

Сущность изобретения

Предложен способ изменения генетических свойств организма путем РНК-интерференции, приводящей к ген-специфическому сайленсингу выбранного гена с помощью молекул РНК, синтезированных *in vitro*, включающий использование молекул РНК, комплементарных в параллельном направлении (пкРНК) мРНК выбранного гена, при этом пкРНК синтезируют *in vivo* или *in vitro* на искусственной последовательности ДНК, имеющей зеркально-симметричную последовательность нуклеотидов (зеркальная инверсия) по отношению к последовательности нуклеотидов гена.

Перечень фигур

Фиг. 1 приводит данные о структуре ДНК-конструкции, содержащей зеркальную последовательность нуклеотидов относительно гена lon *E. coli* и предназначенной для экспрессии пкРНК, где:

а - взаимоотношения последовательностей нуклеотидов гена lon и искусственной химически синтезированной последовательности ДНК, зеркально-симметричной относительно гена (+ цепи соответствуют последовательностям пкРНК parlon и мРНК); синтезированная ДНК в конструкции находится под контролем промотора *lac*, обеспечивающим экспрессию пкРНК parlon;

б - взаимоотношения между мРНК гена lon и пкРНК parlon;

в - гены в lux-регулоне: промоторы pr и pl в lux-регулоне работают на разных цепях, гены показаны светлыми прямоугольниками; Lon белок деградирует продукт гена R, активирующий pl и, тем самым, препятствует работе генов, обеспечивающих люминесценцию.

Фиг. 2 показывает результаты люминесценции клеток *E. coli*, которая наблюдается при сайленсинге гена lon в результате экспрессии (parlon), где:

Lux-регулон Vibrio fischeri был введен в lon$^+$ или lon$^-$ клетки E. coli. В полученные lon$^+$ клетки дополнительно порознь вводили также конструкцию, созданную на основе вектора pUC12, способную экспрессировать пкРНК parlon или исходную плазмиду pUC12, не содержащую вставки. Показана зависимость интенсивности люминесценции суспензии клеток, определяемая с помощью люминометра (□V), от оптической плотности (OD_{550}). Сайленсинг гена lon вызывает свечение трансформантов, содержащих конструкцию parlon.

Фиг. 3 представляет данные о структуре ДНК-конструкции, содержащей зеркальную последовательность нуклеотидов относительно гена *Kruppel* дрозофилы и предназначенной для экспрессии пкРНК (Kr-par), где:

а - взаимоотношения последовательностей нуклеотидов гена Kr и искусственной химически синтезированной последовательности ДНК, зеркально-симметричной относительно гена (+ цепи соответствуют последовательностям пкРНК Kr-par и мРНК); синтезированная ДНК в конструкции находится под контролем промотора РНК полимеразы T7, обеспечивающим экспрессию пкРНК Kr-par (синтез по другой цепи конструкции в векторе pGEM-1 обеспечивается промотором РНК полимеразы SP6);

б - взаимоотношения между мРНК гена Kr и пкРНК Kr-par;

Фиг. 4 показывает фенотипы нормальной личинки дрозофилы и фенокопий Kr, полученных после инъекций пкРНК Kr-par, где:

а - фенотипы нормальной личинки дрозофилы,

б - фенотипы личинки, развившейся из эмбрионов, инъецированных РНК Kr-par, имеющих делеции торакальных сегментов, а также одного переднего абдоминального сегмента,

в - фенотипы личинки, развившейся из эмбрионов, инъецированных РНК Kr-par, имеющих делеции торакальных сегментов, а также трех передних абдоминальных сегментов.

Стрелка указывает атопически развившееся дыхальце, также характерное для фенотипа Kr.

Раскрытие сущности изобретения

В основу предлагаемого изобретения положена задача повышения надежности РНК-интерференции, при которой были бы невозможны реверсии, приводящие к синтезу цепи мРНК на конструкциях, исходно предназначенных для ген-специфичекого сайленсинга.

Предложен способ изменения генетических свойств организма путем РНК-интерференции, приводящей к ген-специфическому сайленсингу выбранного гена с помощью молекул РНК, синтезированных *in vitro*, при этом используют молекулы РНК, комплементарные в параллельном направлении (пкРНК) мРНК выбранного гена, которые синтезируют *in vivo* или *in vitro* на искусственной последовательности ДНК, имеющей зеркально-симметричную последовательность нуклеотидов по отношению к последовательности нуклеотидов гена.

Предлагаемый способ приводит к эффективной РНК-интерференции и ген-специфическому сайленсингу и исключает синтез мРНК, т.к. в конструкциях используется негомологичная искусственная последовательность ДНК.

Предложенный способ осуществляют следующим образом:

1. Выбирают ген, активность которого нежелательна (т.е. она приводит к заболеванию или нарушает биотехнологический процесс);
2. Химически синтезируют искусственную последовательность ДНК, имеющую зеркальное чередование нуклеотидов по отношению к выбраному гену или его части;
3. Готовят генетическую конструкцию, в которой используют разнообразные векторы, содержащие синтезированную ДНК под нужным промотором и другими последовательностями, важными для эффективной экспрессии и для "правильного вписывания" конструкции в хромосомные домены;
4. Конструкцию тем или иным путем вводят в организм для синтеза пкРНК *in vivo* (трансформация), либо пкРНК синтезируют *in vitro* на конструкции и вводят в организм с помощью иньекций.

Изобретение поясняется конкретными примерами осуществления способа изменения генетических свойств организма, в которых эти изменения проявляются как изменения фенотипа, и иллюстрируется 4 фигурами.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

Приведенные далее примеры являются предпочтительными, предназначены лишь для подтверждения возможности осуществления изобретения и не должны стать основанием для ограничения объема притязаний Заявителя. Специалист в данной области техники без труду найдет возможности иных воплощений изобретения, которые безусловно подпадают под притязания Заявителя, отраженные в формуле изобретения, приводимой ниже.

Пример 1. РНК-интерференция в клетках *Escherichia coli* с помощью молекул РНК, комплементарных в параллельном направлении мРНК гена lon, синтезированных *in vivo*.

Ген lon выбран в качестве модели, поскольку он является одним из ключевых в регуляции многих процессов в клетках *E. coli*.

Химически синтезирована искусственная последовательность ДНК длиной 95 bp (bp - пара оснований в ДНК или РНК), имеющая зеркально симметричную последовательность нуклеотидов по отношению к соответствующей области гена lon.

Эта ДНК использована для создания конструкции на основе вектора pUC12, в которой под контролем lac-промотора находится цепь, экспрессирующая пкРНК parlon (Фиг. 1 а, б).

Полученная конструкция с помощью трансформации введена в клетки *E. coli*.

За влиянием пкРНК parlon на активность эндогенного гена lon следят по эффекту последнего на работу lux-регулона, внесенного в клетки *E. coli* из клеток *Vibrio fischeri*. Lon-протеаза является негативным регулятором lux-регулона, т.к. она специфически деградирует белок LuxR. Последний в комплексе с автоиндуктором запускает синтез белков, обеспечивающих люминесценцию. Промоторы pr и pl в lux-регулоне работают на разных цепях, гены показаны светлыми прямоугольниками (Фиг. 1 в). Активно работающий ген lon вызывает репрессию транскрипции lux-регулона, что фенотипически проявляется в подавлении люминесценции. Напротив, сайленсинг гена lon приводит к увеличению концентрации LuxR и, следовательно, к активации транскрипции lux-регулона, что приводит к заметному усилению свечения клеток. Lux-регулон в составе 16 kb BamHI фрагмента ДНК *Vibrio fischeri*, был введен в lon$^+$ клетки *E. coli* K12 AB1157, а также в lon$^-$ клетки *E. coli* K12 AB1899 (lon1).

В полученные lon$^+$ клетки дополнительно порознь вводят также конструкцию, созданную на основе вектора pUC12, способную экспрессировать пкРНК parlon или исходную плазмиду pUC12, не содержащую вставки. Сайленсинг гена lon определяют по возрастанию свечения клеток. Интенсивность люминесценции клеток, экспрессирующих пкРНК parlon возрастает на несколько порядков по сравнению с контролем, содержащем исходную плазмиду pUC12 (Фиг. 2).

При выращивании трансформантов parlon на твердых средах наблюдали развитие "слизистых" колоний, что характерно для lon$^-$ фенотипа или сайленсинга гена lon.

Пример 2. Получение фенокопий *Kruppel* (Kr) при инъекциях в эмбрионы дрозофилы РНК, комплементарной мРНК в параллельном направлении, синтезированной *in vitro*.

Kr - гомеотический ген, активный уже в зиготе и контролирующий образование сегментов на ранней эмбриональной стадии развития дрозофилы выбран в качестве модели, позволяющей наблюдать раннее развитие в многоклеточном организме. Мутанты Kr имеют делеции прилежащих торакальных и передних абдоминальных сегментов. Фенотипически это заметно сразу после развития кутикулы и вылупливания личинок. Мутанты Kr имеют делеции торакальных сегментов и от одного до нескольких абдоминальных сегментов, а иногда также атопически развившиеся дыхальца в передней части тела личинки [E. Weischaus, C. Nusslein-Volhard, H. Kluding, Development, 1984, vol. 104, p. 172]. Таким образом, мутанты *Kruppel* имеют уникальный фенотип, проявляющийся уже через сутки развития эмбрионов дрозофилы, что удобно для изучения влияния РНК на фенотип. Дополнительным аргументом с пользу выбора данной модели было то обстоятельство, что влияние иньекций антисмысловой РНК Kr было проведено ранее [U.B. Rosenberg, A. Preiss, E. Seifert, H. Jackle, D.C. Knippe, Nature, 1985, vol. 313, p. 703].

Химически синтезируют искусственную последовательность ДНК длиной 160 bp, имеющую симметричную последовательность нуклеотидов по области гена Kr (Фиг. 3 а, б). Следует подчеркнуть, что антисмысловые РНК синтезируют на незначащей цепи того же самого гена, тогда как пкРНК может быть синтезирована только на гетерологичной последовательности ДНК, имеющей зеркально-симметричное чередование.

Синтезированную ДНК используют для получения конструкции в векторе pGEM-1, позволяющим с промотора РНК полимеразы T7 вести синтез пкРНК. пкРНК была названа Kr-par, т.к. она комплементарна мРНК гена Kr в параллельном направлении.

Эмбрионы линии Oregon RC инъецируют препаратами пкРНК в область плазмы заднего полюса на стадии синцития и инкубируют под водой при 25^0C в течение 18-24 часов. Затем готовят препараты кутикулы и наблюдают развитие сегментов личинок под фазово-контрастным микроскопом.

Обнаружено развитие личинок имеющих характерный Kr-фенотип. В контрольных экспериментах, после иньекций РНК, синтезированной на противоположной цепи той же конструкции с помощью SP6 РНК полимеразы, наблюдают только развитие нормальных личинок.

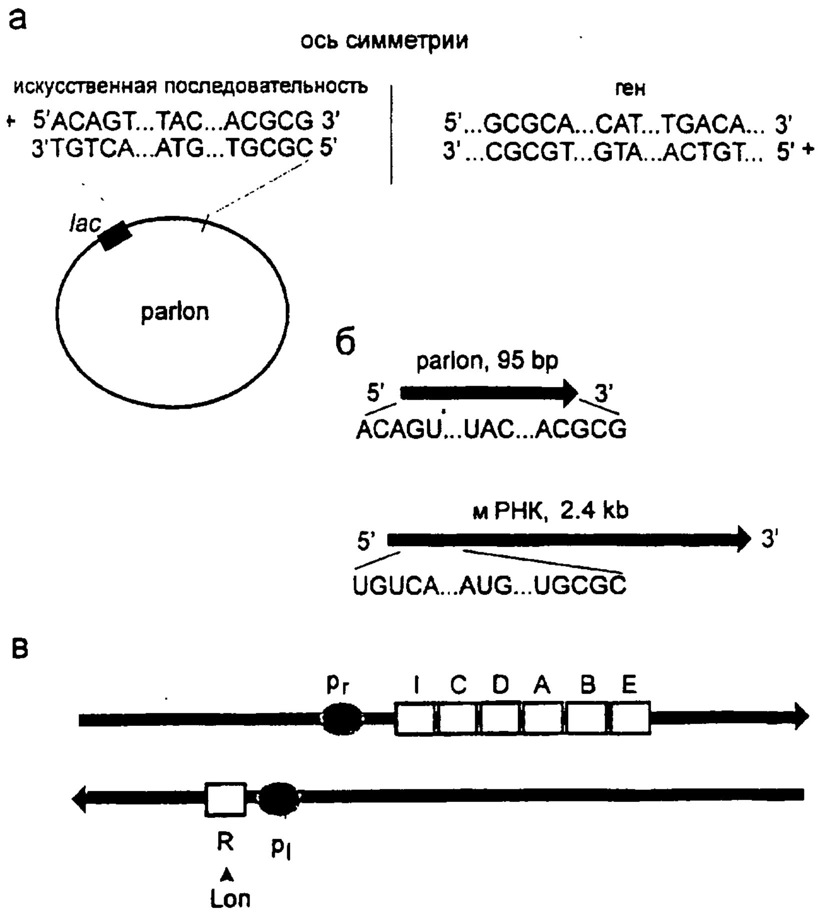
Фиг. 4 представляет нормальную личинку (а), а также две личинки, полученные после иньекций препарата Kr-par (б, в). Последние имеют делеции торакальных сегментов и одного или трех брюшных сегментов и эктопически развитое дыхальце в передней части тела личинки, что характерно для фенотипа Kr. Частота появления фенокопий Kr после иньекций РНК Kr-par примерно соответствует таковой после иньекций соответствующей асРНК [U.B. Rosenberg, A. Preiss, E. Seifert, H. Jackle, D.C. Knippe, Nature, 1985, vol. 313, p. 703]. Показано, что в многоклеточном организме, воздействуя пкРНК на экспрессию ключевого гена дифференцировки, получают направленное изменение генетических свойств организма.

Таким образом, обнаружено влияние зеркальных инверсий нуклеотидных последовательностей, тем или иным путем введенных в организм, на его фенотип. Основное преимущество предлагаемого способа состоит в том, что зеркальные последовательности способны обеспечить синтез пкРНК и РНК-интерференцию, но, будучи гетерологичными последовательностями, не могут синтезировать соответствующую мРНК. Поэтому при использовании этого подхода ("палиндромный подход"), в отличие от традиционного способа, используещего асРНК ("антисмысловой подход"), не может произойти реверсия и начаться синтез цепи мРНК.

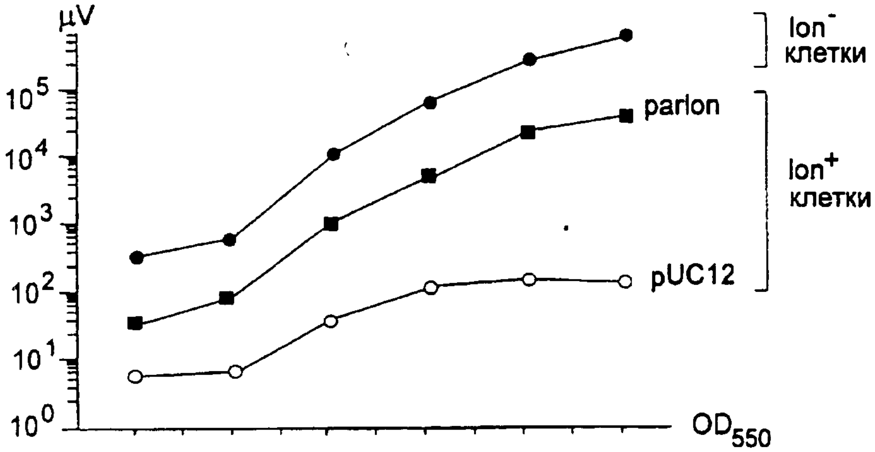
Изобретением предложен общий подход к изменению генетических свойств организма, основанный на биологических свойствах зеркальных инверсий нуклеотидных последовательностей и реализующийся в РНК-интерференции, приводящей к ген-специфическому сайленсингу. Предлагаемый способ, основанный на обнаруженной высокой и избирательной биологической активности транскриптов с зеркальных инверсий нуклеотидных последовательностей, приводит к изменению фенотипа и может быть использован для целей генотерапии в медицине, а также в сельском хозяйстве и в промышленной биотехнологии для ген-специфического сайленсинга тех генов, экспрессия которых способствует развитию тех или иных заболеваний или нарушает процесс наработки необходимого продукта.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

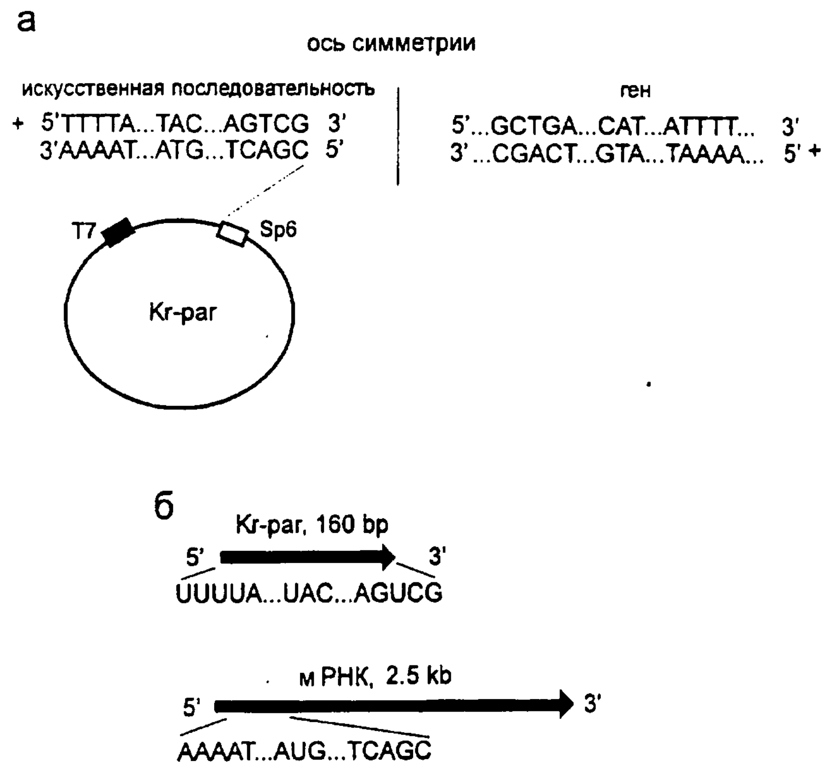
Способ изменения генетических свойств организма путем РНК-интерференции, приводящей к ген-специфическому сайленсингу выбранного гена с помощью молекул РНК, синтезированных *in vitro*, **отличающийся** тем, что используют молекулы РНК, комплементарные в параллельном направлении (пкРНК) мРНК выбранного гена, при этом пкРНК синтезируют *in vivo* или *in vitro* на искусственной последовательности ДНК, имеющей зеркально-симметричную последовательность нуклеотидов (зеркальная инверсия) по отношению к последовательности нуклеотидов гена.


а
ось симметрии
искусственная последовательность
+ 5'ACAGT...TAC...ACGCG 3'
3'TGTCA...ATG...TGCGC 5'
ген
5'...GCGCA...CAT...TGACA... 3'
3'...CGCGT...GTA...ACTGT... 5' +
lac
parlon
б
parlon, 95 bp
5'
3'
ACAGU...UAC...ACGCG
м РНК, 2.4 kb
5'
3'
UGUCA...AUG...UGCGC
в
p_r
I C D A B E
R
p_l
Lon

Фиг. 1

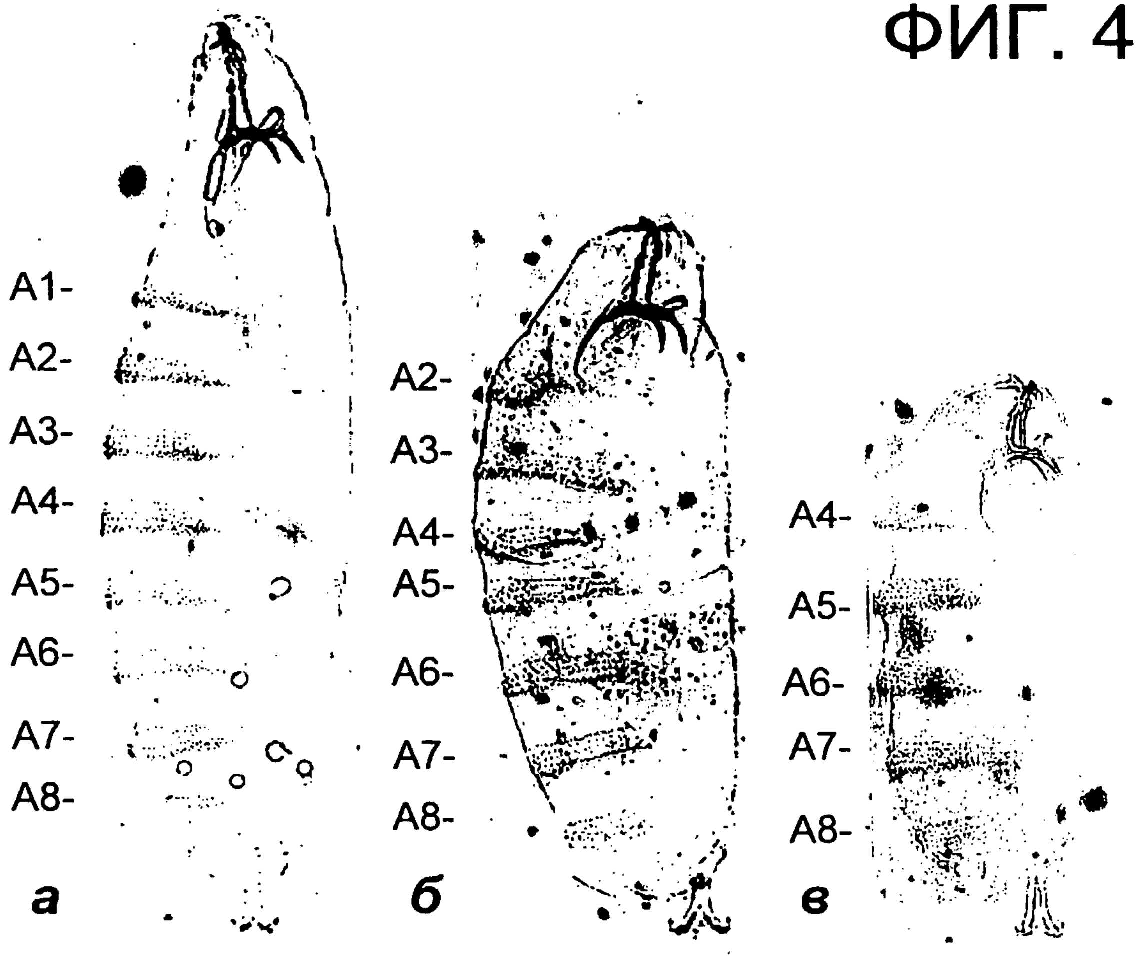

µV
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
OD$_{550}$
lon$^-$ клетки
parlon
lon$^+$ клетки
pUC12

Фиг. 2


а
ось симметрии
искусственная последовательность
+ 5'TTTTA...TAC...AGTCG 3'
3'AAAAT...ATG...TCAGC 5'
ген
5'...GCTGA...CAT...ATTTT... 3'
3'...CGACT...GTA...TAAAA... 5' +
T7
Sp6
Kr-par
б
Kr-par, 160 bp
5'
3'
UUUUA...UAC...AGUCG
м РНК, 2.5 kb
5'
3'
AAAAT...AUG...TCAGC

Фиг. 3

ФИГ. 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/RU 00/000504

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC7: C12N 15/00, 15/63 // A01N 48/00
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC B

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC7 : C12N 15/00, 15/09, 15/10, 15/11, 15/63, A01N 48/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98/53083 A1 (ZENECA LIMITED) 26 November 1998 (26.11.98)	1
A	RU 94046161 A1 (UNIVERSITY TECHNOLOGIES INTERNATIONAL INC.) 10 May 1997 (10.05.97)	1

☐ Further documents are listed in the continuation of box C. ☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 23 February 2001 (23.02.01)	Date of mailing of the international search report 01 March 2001 (01.03.01)
Name and mailing address of the ISA/RU	Authorised officer Telephone No.

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Международная заявка №
PCT/RU 00/00504

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

C12N 15/00, 15/63 // A01N 48/00

Согласно международной патентной классификации (МПК-7)

В. ОБЛАСТИ ПОИСКА:

Проверенный минимум документации (система классификации и индексы) МПК-7:

C12N 15/00, 15/09, 15/10, 15/11, 15/63, A01N 48/00

Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки:

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, поисковые термины):

С. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
X	WO 98/53083 A1 (ZENECA LIMITED) 26 November 1998	1
A	RU 94046161 A1 (ЮНИВЕРСИТИ ТЕКНОЛОДЖИС ИНТЕРНЭШНЛ ИНК.) 10.05.1997	1

☐ последующие документы указаны в продолжении графы С. ☐ данные о патентах-аналогах указаны в приложении

* Особые категории ссылочных документов:

A документ, определяющий общий уровень техники

E более ранний документ, но опубликованный на дату международной подачи или после нее

O документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

P документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета и т.д.

T более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

X документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну и изобретательский уровень

Y документ, порочащий изобретательский уровень в сочетании с одним или несколькими документами той же категории

& документ, являющийся патентом-аналогом

Дата действительного завершения международного поиска: 23 февраля 2001 (23.02.2001)	Дата отправки настоящего отчета о международном поиске: 01 марта 2001 (01.03.2001)
Наименование и адрес Международного поискового органа: Федеральный институт промышленной собственности Россия, 121858, Москва, Бережковская наб., 30-1 Факс: 243-3337, телетайп: 114818 ПОДАЧА	Уполномоченное лицо: О. Куликова Телефон № (095)240-25-91

Форма PCT/ISA/210 (второй лист)(июль 1998)